昆虫变态发育过程中的细胞自噬和凋亡

史艳霞[1]，李庆荣[1]，黄志君[1]，曾文年[1]，胡占英[1]，
雷淑英[1]，邓小娟[1]，杨婉莹[1]，曹 阳[1,*]，冯启理[2]
（1.华南农业大学动物科学学院，广州 510642；2.华南师范大学生命科学学院，广州 510631）

摘要：在昆虫变态期，幼虫组织发生退化或消亡，原因在于蜕皮甾醇激素（ecdysteroid），即通常所说的蜕皮激素，诱导这些组织的细胞发生了自噬（autophagy）和凋亡（apoptosis）的程序性细胞死亡（programmed cell death，PCD）。一般情况下，自噬途径构成一种饥饿应激适应性以避免细胞的死亡，表现为低水平 Cvt 泡（Cvt vesicle）和自噬体（autophagosome）对部分胞质溶胶、蛋白聚集体和细胞器的吞噬和降解。昆虫进入变态发育时，由于蜕皮激素的激活，由遗传级联系统调控的 PCD 机制被启动，低水平的常态自噬转入高水平的自噬并同时诱发凋亡，细胞进入不可逆的死亡，导致幼虫组织在变态期退化或消亡。对果蝇 *Drosophila* 变态期 PCD 机制中最重要的发现是：（1）在自噬发生的 PI3KⅠ-Tor 和 PI3KⅢ的分子通路中，由自噬相关蛋白 Atg1 引发的高水平自噬能够诱导凋亡；（2）蜕皮激素诱导表达的 βFTZ-F1，E93，BR-C，E74A 等转录因子不但激活凋亡的 Caspases 通路，还能诱导自噬的发生。

关键词：昆虫；变态；自噬；凋亡；程序性细胞死亡
中图分类号：Q966 **文献标识码：**A **文章编号：**0454-6296(2009)01-84-11

Autophagy and apoptosis in insect cells during metamorphosis

SHI Yan-Xia[1], LI Qing-Rong[1], HUANG Zhi-Jun[1], ZENG Wen-Nian[1], HU Zhan-Ying[1], LEI Shu-Ying[1], DENG Xiao-Juan[1], YANG Wan-Ying[1], CAO Yang[1], FENG Qi-Li[2] (1. College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2. College of Life Sciences, South China Normal University, Guangzhou 510631, China)

Abstract: During insect metamorphosis, degeneration or dissolution of larval tissues was involved in programmed cell death (PCD) including autophagy and apoptosis induced by ecdysteroids. Autophagy, which usually responds to hungry to avoid cell death, appears as a low-level Cvt vesicle and autophagosome to swallow and dissolve partial cytosol, protein aggregates and cellular organelles. PCD pathway is initiated by ecdysteroids and regulated by genetic cascade system during the period of insect metamorphosis. The initiation of PCD pathway by ecdysteroids turns the low-level normal autophagy to high-level one and triggers apoptosis at the same time, and leads to irreversible death. Subsequently larval tissues degenerate or dissolve completely. The most important discoveries of PCD in fruit fly *Drosophila* metamorphosis include: (1) In the molecular pathways of PI3KI-Tor and PI3KIII, high-level autophagy initiated by Atg1 (autophagy-related protein 1) can induce apoptosis; (2) Transcription factors induced by ecdysteroids, including βFTZ-F1, E93, BR-C and E74A, can not only activate the apoptosis pathway, but also induce autophagy pathway.

Key words: Insect; metamorphosis; autophagy; apoptosis; programmed cell death (PCD)

全变态昆虫在蛹期经历着一个剧烈的发育过程，在这一时期的幼虫组织完全消亡或退化，成虫盘细胞迅速分化增殖。昆虫的变态发育与蜕皮甾醇激素（ecdysteroid），即通常所说的蜕皮激素，包括 20-羟基蜕皮酮（20-hydroxyecdysone, 20E）和蜕皮酮（ecdysone, Ecd）的诱导有关。家蚕 *Bombyx mori* 由 5 龄末期幼虫进入蛹变态前，虫体内的保幼激素（juvenile hormone, JH）分泌活性降至很低，由促前胸腺素

基金项目：国家重点基础研究发展规划（"973"计划）项目（2005CB121002）；国家高技术研究发展计划（"863"计划）重大专项（2006AA10A119）；国家自然科学基金项目（30370716，30570938）
作者简介：史艳霞，女，1983 年 1 月生，山东菏泽人，博士研究生，研究方向为昆虫分子生物学，E-mail: shiyanxia@stu.scau.edu.cn
* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: caoyang@scau.edu.cn
收稿日期 Received: 2008-10-12；接受日期 Accepted: 2008-12-16

(prothoracicotropic hormone, PTTH)促进前胸腺(prothoracic gland, PTG)合成Ecd的分泌活性陡增(Gu and Chow, 2005a, 2005b; Gu, 2006),释放到血淋巴中的Ecd再转化成具更高活性的20E(郭恩恩等, 2008),所以血淋巴中蜕皮激素的含量升高是导致丝腺、前胸腺等幼虫专性组织(larval-specific tissue)完全消亡和中肠等幼虫组织迅速退化的原因。

昆虫幼虫组织在变态期的退化或消亡并不是过去认为的那么简单,仅仅是一个组织化学的降解过程。目前对于这种细胞死亡的机制已有较深入的认识,即在昆虫的变态期,由蜕皮激素激活的遗传级联系统引发了幼虫组织的程序性细胞死亡(programmed cell death, PCD)。在这一PCD机制中,细胞自噬(autophagy)和凋亡(apoptosis)是其中两种主要的死亡途径,它们之间存在相互联系的分子通路。

本文将在有关酵母和哺乳动物细胞自噬和凋亡的认识基础上,重点介绍目前对昆虫变态期发生细胞自噬和凋亡的研究进展,旨在加深对昆虫变态发育过程中PCD机制的认识。

1　细胞自噬和凋亡的定义

细胞自噬和凋亡是广泛存在于真核生物细胞的生命现象。早在1962年,Ashford和Porter就已在老鼠肝细胞切片中观察到包裹细胞质的直径为0.4~0.6 μm的单层膜"小体(microbody)"结构,这是最早发现的细胞主动降解内容物的现象。在20世纪60年代,Schin和Clever(1965)以及Scharrer(1966)分别在摇蚊*Chironomus tentans*末龄幼虫至蛹羽化期间的唾腺细胞和蜚蠊目(Blattariae)昆虫的前胸腺细胞中发现并从形态特征上描述了这种有溶酶体参与的小体结构,但一直未引起重视。进入21世纪,人们对细胞自噬有了全新的认识,发现自噬与人类肿瘤,神经退行性疾病以及个体的正常发育、寿命、免疫(Xu *et al.*, 2008)等密切相关,也是昆虫蜕皮和变态发育中退化细胞死亡的主要原因之一(Müller *et al.*, 2004)。

在20世纪70至80年代,对哺乳动物和线虫发育的大量研究显示,在动物退化组织中出现的细胞死亡,形态特征上表现为细胞收缩、核染色质凝聚(核固缩/浓缩)和出现凋亡小体(apoptotic body),同时发生核DNA断裂,后者可以通过特征性的"DNA-ladder"电泳谱检测,由于这种核DNA断裂片段具有3-OH端,也可以通过末端标记法(TUNEL method)加以检测。Kerr等(1972)将这种不同于"细胞坏死(necrosis)"的细胞死亡事件命名为细胞凋亡。

现在对果蝇*Drosophila*在变态期由蜕皮激素诱导发生细胞凋亡的分子通路已基本清楚:蜕皮激素通过与蜕皮激素受体(ecdysone receptor, EcR)形成的EcR/USP异二聚体结合,激活了蜕皮激素级联系统中DHR3,βFTZ-F1,BR-C,E74A,E93,E75等初级和次级转录因子以及凋亡诱导因子(inducers of apoptosis)的表达活性,后者通过在蛋白水平上抑制凋亡抑制蛋白(inhibitors of apoptosis protein, DIAPs)的活性,从而打开细胞凋亡的Caspases通路(李庆荣等, 2006)。

根据对酵母和哺乳动物的研究,人们对PCD机制中各种细胞物质的降解走向已达成基本的共识:细胞中短寿命蛋白比如周期蛋白,主要以蛋白质的泛素化途径进行降解;细胞质中的细胞器和长寿命蛋白质的降解则主要依赖自噬途径(Crotzer and Blum, 2005; Yang *et al.*, 2005),细胞核和细胞器物质还可以通过凋亡途径的caspases激活的水解酶活性加以降解(Wyllie *et al.*, 1980)。

在一般情况下,自噬构成一种饥饿应激适应性以避免细胞的死亡。在胞外营养缺乏的条件下,细胞通过自噬来增加胞内代谢产物以满足继续生存的需要(细胞拯救);而在其他条件下,例如细胞拯救失败或在昆虫变态期,则引发细胞高水平的自噬和凋亡,出现不可逆的细胞死亡,以迅速清除和降解多余的、或受损的、或衰老退化的细胞(Maiuri *et al.*, 2007)。

对细胞自噬的研究,2000年以来在酵母和哺乳动物已鉴定报道了近30个参与其功能的自噬相关基因(autophagy-related gene, *Atg*)(Klionsky *et al.*, 2003; Levine and Klinsky, 2004; Yang *et al.*, 2005),在果蝇中也相继鉴定了9个与酵母同源的自噬相关蛋白(Atgs)(Klionsky *et al.*, 2003)。近几年随着对自噬与凋亡相互关系、特别对两者之间的分子通路的研究,人们进一步认识到这两种细胞死亡途径可以发生相互诱导或抑制(Baehrecke, 2003; Scott *et al.*, 2007)。从这种分子通路联络的角度,将细胞凋亡和自噬分别称为Ⅰ型细胞死亡(programmed cell death Ⅰ, PCD Ⅰ)和Ⅱ型细胞死亡(programmed cell death Ⅱ, PCD Ⅱ),则可以更好地理解细胞死亡的PCD机制,解释为什么细胞的死亡可以选择自噬或者凋亡两种方式,甚至在同一细胞中发生的自噬可

以引发凋亡或者凋亡可以诱导自噬(Xue *et al.*, 1999; Guillon-Munos *et al.*, 2006)。

2 昆虫细胞自噬和凋亡的形态发生特征

自噬作为一种自我保护机制,表现为细胞的自我吞噬作用,即清除蛋白聚集体(致密体)、胞质溶胶和有害细胞器,当达到一定程度就会引发细胞不可逆的萎缩和功能损伤,进而导致细胞死亡,表现为大量的自噬泡和致密体占据的空间大致等于或大于游离的胞质溶胶和细胞器(Maiuri *et al.*, 2007)。

形态学上定义的细胞自噬特征主要表现为线粒体膨胀、内质网和高尔基体肿大,细胞内出现大量包裹着胞质及细胞器的泡状结构。已经发现的细胞自噬形式有小自噬(microautophagy)、分子伴侣介导的自噬(chaperon-mediated autophagy, CMA)和大自噬(macroautophagy)等 3 种形式(Levine and Klinsky, 2004; Crotzer and Blum, 2005; Yang *et al.*, 2005)。在真核生物发生的自噬主要为大自噬,它包括 Cvt 途径(cytoplasm-to-vacuole targeting pathway)和通常意义上的 Autophagy 途径(autophagy pathway),后者是唯一能够降解线粒体、高尔基体、内质网等细胞器和细胞大分子聚集体(如致密体)的自噬方式。

依据对酵母发生自噬的观察,一般认为真核生物发生自噬的形态特征主要表现为:在多种自噬相关蛋白的作用下,被募集(recruitment of cargo)装配(cargo packaging)的细胞器和胞质组分分别由双层"C"型膜包裹,闭合形成自噬泡(autophagic vacuoles),吞噬细胞器的自噬泡又称自噬体(autophagosome),吞噬胞质组分的则称为 Cvt 泡(Cvt vesicle),进而自噬体和 Cvt 泡分别与溶酶体膜或液泡膜融合,形成单层膜的自噬小体(autophagic body)和 Cvt 小体 (Cvt body)后被降解(Levine and Klinsky, 2004; Yorimitsu and Klionsky, 2005; Klinosky *et al.*, 2007)(图 1)。

自噬体和 Cvt 泡的大小差异显著。在电子显微镜中观察,后者为小泡状结构,包裹的内含物无定形,前者为大泡状结构,可以看到内部各种细胞器结构,例如分别包裹线粒体和内质网的自噬体被称为线粒体自噬体(mitophagy)和内质网自噬体(reticulophagy)。

由自噬和凋亡角度重新审视昆虫变态期幼虫组织退化和细胞死亡的形态学特征,较早报道的是 Bowen 等(1996)以及 Dai 和 Gilbert(1997)分别对红头丽蝇 *Calliphora vomitoria* 唾腺细胞和烟草天蛾 *Manduca sexta* 前胸腺细胞的研究,前者发生自噬的空泡化膨大,但难以看到凋亡的核染色质浓缩和凋亡小体,后者观察到了凋亡小体和自噬的 Cvt 泡。新近的报道是 Vilaplana 等(2007)对灰翅夜蛾 *Spodoptera littoralis* 的研究,他们分析了灰翅夜蛾凋亡抑制蛋白的 mRNA 在幼虫末龄期、预蛹期和蛹期的卵巢、睾丸、唾腺、脂肪体、表皮、大脑和中肠的转录活性差异,通过共聚焦显微镜观察了 LysoTracker(一种染料)特异染色的溶酶体形态变化和通过末端标记法以及 caspase-3 抗体的免疫组化分析,重点描述了灰翅夜蛾变态期中肠细胞死亡的形态发生特征,认为灰翅夜蛾的中肠细胞死亡显示了自噬和凋亡的双重特点,但未对自噬和凋亡的形态学特征进行区分。

我们于 2005 年对家蚕蛹变态期丝腺组织的退化与细胞凋亡特征进行了观察,发现家蚕丝腺组织从吐丝期开始退化,到化蛹 3 d 完全消亡,在这一过程中的腺细胞核浓缩剧烈,进入化蛹 1 ~ 2 d 已能检测到大多数细胞发生凋亡的特征性核 DNA 断裂,但未观察到凋亡小体(钟仰进等, 2005)。Mpakou 等(2006, 2008)采用 mono-dansylcadaverine(MDC)荧光染色,借助光镜、透射电镜观察,研究了在家蚕卵子发育过程中的滋养细胞退化,发现滋养细胞的死亡原因除有凋亡作用外还有自噬的作用,它们协同作用,更快速和有效地清除和降解滋养细胞。这是目前为止仅有的关于家蚕变态期发生细胞自噬和凋亡关系的报道。

在其他昆虫变态期发生的细胞自噬和凋亡也显示与上述相似的形态学特征。例如 Kinch 等(2003)用 20E 诱导烟草天蛾的 APR(6)s 细胞,将发生依赖 caspase 活性的自噬和发生核 DNA 断裂的凋亡,在细胞形态的变化中有大量的自噬体和液泡样的空泡聚集,线粒体群集成簇,核糖体聚集成块状,但未见核染色质浓缩和出现凋亡小体。Müller 等(2004)以及 Lockshin 和 Zakeri(2004)分别在烟草天蛾的下唇腺和脂肪体细胞中也观察到自噬和凋亡的部分形态学特征,但凋亡小体不明显。Nezis 等(2006)的观察发现,在果蝇、*Bactrocera oleae* 和 *Ceratitis capitata* 等昆虫卵泡发育的晚期阶段有大量液泡样 Cvt 泡的发生。Velentzas 等(2007)在果蝇变态期退化卵室的营养细胞中观察到凋亡的染色质浓缩、DNA 断裂和同时发生的液泡样 Cvt 泡。Silva - Zacarin 等

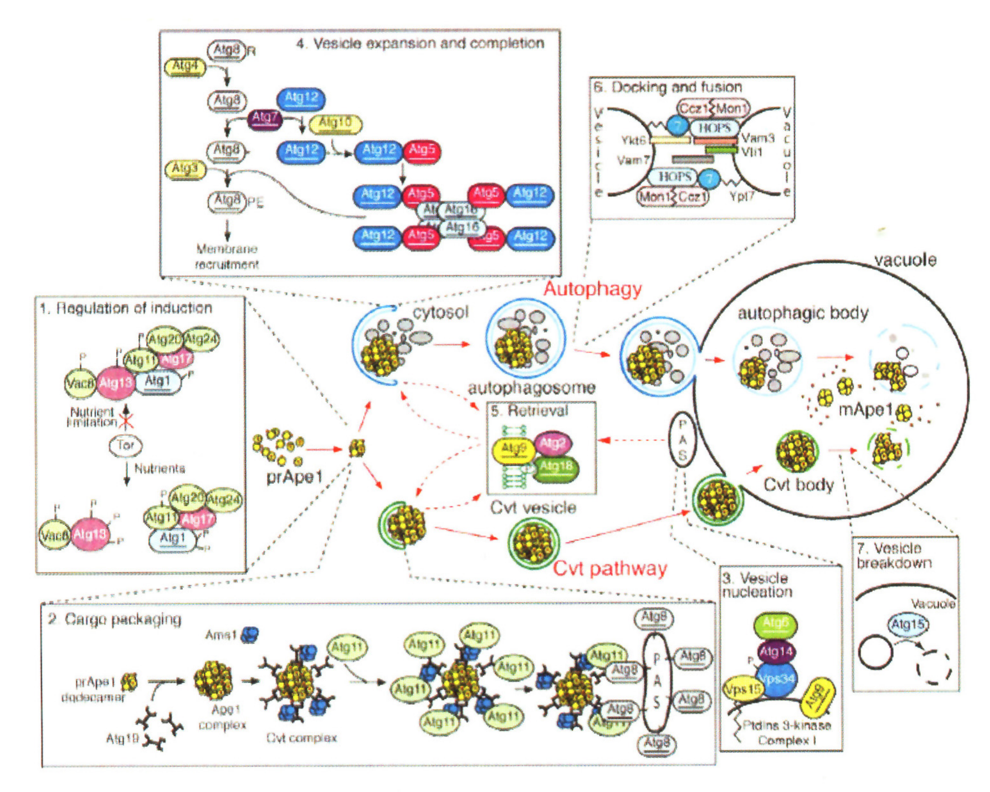


图 1　酵母 Autophagy 途径和 Cvt 途径模式图[引自 Levine 和 Klionsky (2004)]

Fig. 1　Schematic representation of the autophagy and cytoplasm-to-vacuole targeting (Cvt) pathways in yeast (cited from Levine and Klionsky, 2004)

自噬的主要过程如下 The major steps of autophagy are as follows: 1. 自噬的诱发: Tor 激酶和下游的效应因子调控自噬的诱发,及其自噬途径和 Cvt 途径的相互转换 Regulation of induction: Tor kinase and downstream effectors regulate induction of autophagy and conversion between autophagy and the Cvt pathway; 2. 货物的装载:Cvt 途径和过氧化物酶体的退化是一个特异的自噬过程,需要经过一个识别和装载的过程 Cargo packaging: The Cvt pathway and peroxisome degradation are specific autophagic processes requiring recognition and packaging of cargo; 3. 囊泡晶核的形成:酵母中 PtdIns 3-kinase 和 Vps34 是形成晶核的两种不同的磷脂激酶复合体 Vesicle nucleation: The yeast PtdIns 3-kinase and Vps34, form part of the core machinery of two distinct lipid kinase complexes; 4. 囊泡的扩展和完成:两种泛素蛋白样途径参与了这一过程 Vesicle expansion and completion: Two ubiquitin-like (Ubl) proteins are required for autophagy-related pathways; 5. 回收利用 Retrieval; 6. 锚定和融合:自噬体和 Cvt 泡与液泡融合的过程与所有的终止于液泡的融合途径类似 Docking and fusion: The components required for fusion of the autophagosome or Cvt vesicle with the vacuole are common to all pathways that terminate at the vacuole; 7. 囊泡的降解 Vesicle breakdown.

(2007) 的研究结果显示,在意大利蜜蜂 *Apis mellifera* 唾腺细胞死亡的自噬和凋亡之间存在一些形态学上的联系。

上述研究显示,昆虫变态期发生的细胞自噬和凋亡有一些基本的特征:可以观察到发生高水平自噬的 Cvt 泡和自噬体,有时能够观察到凋亡的核染色质浓缩和凋亡小体,当大部分细胞发生凋亡时,可以检测到特征性的核 DNA 断裂和末端标记法的阳性信号。

3　昆虫变态期细胞自噬和凋亡的分子通路联络

人们在 2000 年以前一直将细胞自噬和凋亡看成两个完全不同的概念,认为 PCD 的实质就是细胞凋亡,自噬与凋亡之间没有必然的联系(Clarke, 1990; Bowen *et al.*, 1996; Bursch *et al.*, 2000)。现在人们对 PCD 机制的认识已有了新的理解,发现在甾醇类激素、饥饿、雷帕霉素靶位点(target of rapamycin, Tor)激酶(Tor 激酶)和胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor, IGF)等信号诱导下,自噬和凋亡之间存在分子通路(Baehrecke, 2003; Scott *et al.*, 2007)。

Maiuri 等(2007)对细胞自噬与凋亡在 PCD 机制中的交叉功能进行了综述。认为在一定的环境条件下,自噬构成一种应激适应性来规避细胞的死亡,这种情况下表现为对凋亡途径(PCD Ⅰ)的抑制;而在其他条件下,自噬就构成细胞死亡的一种途径

(PCD Ⅱ)。以自噬方式进入PCD的细胞,同时通过凋亡快速清除细胞核和细胞器,加速细胞的死亡进程。近年的研究发现自噬和凋亡的分子通路可以由共同的上游信号诱发,但有时这两种信号通路又是相互独立、相互排斥的,后者又显示自噬与凋亡可能具有不同的启动阀,或是具有一种细胞可以决定两个反应的机制(Maiuri *et al.*, 2007)。

根据近几年的研究进展,我们初步绘制了细胞发生自噬和凋亡的分子通路联络(图2)。昆虫自噬和凋亡的分子通路除遵循酵母和哺乳动物的基本通路外,还有一些区别于酵母和哺乳动物的个性特征(图2中虚线以下部分)。这些个性特征主要来自于对果蝇的研究结果,构成了对动物PCD机制中自噬和凋亡相互关系的重要补充。以下将分小节简要介绍这种分子通路的关系,并重点介绍在昆虫中初步发现的有关自噬和凋亡分子通路的研究进展。

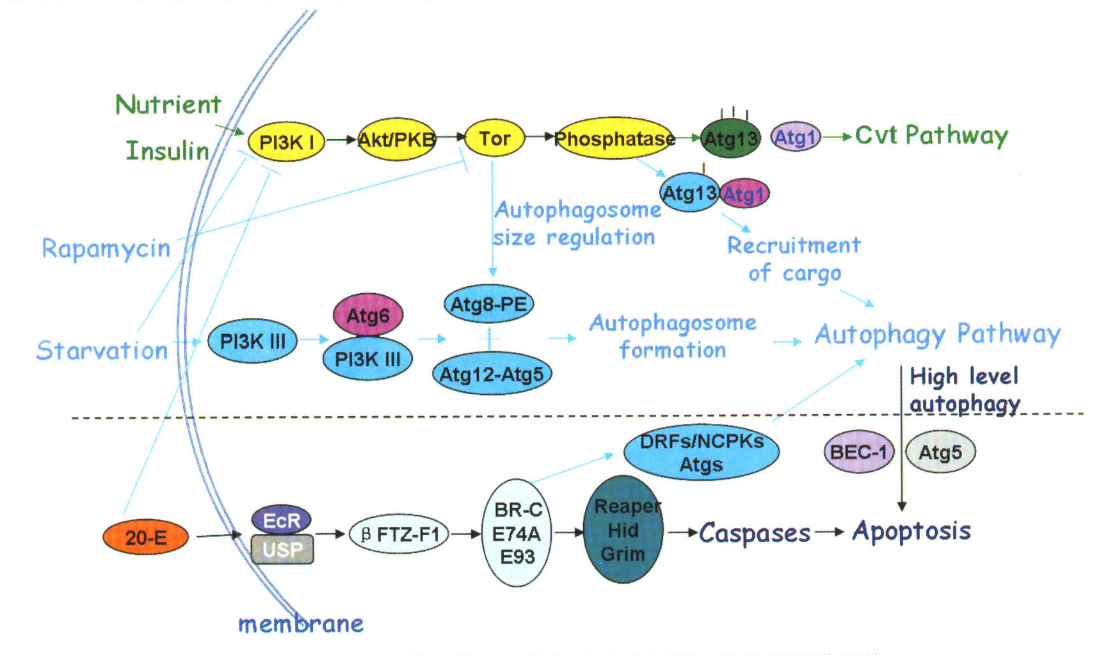


图2 在酵母和果蝇等发现的细胞自噬与凋亡的分子通路联络

Fig. 2 Molecular cross-talk between autophagy and apoptosis in yeast and *Drosophila*

虚线上方主要为由酵母发现的分子通路,果蝇和线虫除遵循酵母的分子通路特征外,还有其个性的通路特征(虚线下方所示)。图中Atg13上方标注的黑色短线"|"代表一个磷酸基团;紫色Atg6和Atg1代表其在自噬途径中的活性形式,它们分别与PI3KIII和Atg13的结合促进了自噬;淡紫色Atg1和BEC-1代表在自噬途径中的失活形式,不与Atg13结合的Atg1不能引发自噬,去除BEC-1导致线虫CED3/caspase依赖性的凋亡;灰色标注剪切后的Atg5使细胞走向凋亡途径。The molecular pathways which are summarized in yeast are demonstrated above the dash line. Besides similar pathways, those of *Drosophila* and *Caenorhabditis elegans* have their unique characteristics (as shown below the dash line). Phosphate groups of Atg13 are shown as black short lines '|'. Active forms of Atg6 and Atg1 which are colored as purple bind with PI3KIII and Atg13 respectively and activate autophagy subsequently. Inactive forms of Atg1 and BEC-1 shown as purply fail to bind to the Atg13 and do not trigger antophagy. Removal of BEC-1 leads to CED3/caspase-dependent apoptosis in *C. elegans*, while spliced Atg5 (marked in grey) initiates apoptosis.

3.1 自噬的PI3K Ⅰ-Tor分子通路

Tor激酶是自噬途径中第一个被鉴定的由饥饿信号诱导的关键分子(Noda and Ohsumi, 1998),它控制营养敏感信号的传递,本身受营养的正调控。Phosphoinositide 3-kinase(PI3K)是一类磷酸肌醇糖环3′羟基磷酸化酶,分为Ⅰ,Ⅱ和Ⅲ型,其中参与调控Autophagy途径和Cvt途径的为PI3K Ⅰ和PI3K Ⅲ,它们在自噬中具有相反的作用,PI3K Ⅰ是自噬的负调控子(Petiot *et al.*, 2000)。

Noda等(2002)提出了自噬体和Cvt泡形成的NAE(nucleation- assembly-elongation)模型(图1),认为自噬体和Cvt泡均来自于一个前自噬体结构(the preautophagosomal structure, PAS),它通过营养或饥饿信号控制PI3K Ⅰ调节Tor使之具有不同的走向(Kamada *et al.*, 2000; Petiot *et al.*, 2000)。

在营养丰富的条件下,PAS结构募集细胞组分成核,直接形成Cvt泡,这种情况下发生低水平Cvt途径的自噬,它作为细胞的一种常态自噬用以保持自身代谢的动态平衡。在此环境中,丰富的营养信号通过胰岛素(insulin)或胰岛素样生长因子(IGF)与胰岛素受体的结合,级联促进PI3K Ⅰ(包括膜脂质的磷酸化)和PI3K下游的效应分子"Akt / PKB"

（一种富含丝氨酸和苏氨酸的蛋白激酶，其基因序列与 T 细胞淋巴瘤中的逆转录病毒癌基因 *v-Akt* 同源，其蛋白结构与蛋白激酶 A 和蛋白激酶 C 相似）的活性，进而活化 Tor 激酶的功能，实现 PI3KⅠ-Tor 分子通路对细胞发生 Autophagy 途径自噬的抑制（Franke *et al.*, 2003; Baehrecke, 2005; Sarbassov *et al.*, 2005）。

目前还不清楚 Tor 激酶抑制自噬的生化机制，但已知它与一种包含自噬相关蛋白 Atg1 的复合物有关（Klionsky and Emr, 2000; Kamada *et al.*, 2000; Levine and Klionsky, 2004; Yang *et al.*, 2005）。如图 2 所示：在营养丰富的条件下，通过 PI3KⅠ- Akt / PKB-Tor 分子通路，直接或间接地使自噬相关蛋白 Atg13 高度磷酸化，导致它与 Atg1 结合的亲和性降低而使 Atg1 活性下降，阻断了 Autophagy 途径的自噬，细胞维持低水平 Cvt 途径的常态自噬，目前已知参与这一过程的自噬相关蛋白有 Atg13，Atg1 和 Atg17；反之，饥饿或雷帕霉素的处理能够分别在 PI3KⅠ和 Tor 节点抑制其通路活性，使 Atg13 脱磷酸化，与 Atg1 的亲和力增强，Atg1 一旦和 Atg13 结合即导致细胞发生低水平 Autophagy 途径的自噬。所以，低水平 Autophagy 途径的自噬是在饥饿条件下细胞进入 PCD 前的一种早期保护机制，Atg1 有可能是细胞在 Cvt 途径和 Autophagy 途径之间转换的分子开关（Yang *et al.*, 2005; Yorimitsu and Klionsky, 2005）。

3.2 自噬的 PI3KⅢ分子通路

饥饿除通过 PI3KⅠ-Tor 分子通路抑制低水平 Autophagy 途径的自噬外，更主要的作用是通过 PI3KⅢ分子通路促进细胞发生高水平 Autophagy 途径的自噬。在这一分子通路中，PI3KⅢ可与 Atg6 结合形成激酶复合物，引发自噬相关蛋白（Atgs）在两大泛素系统（Atg8-PE 和 Atg12-Atg5）中的募集并结合于 PAS 膜上（至今未证实 PAS 膜的来源），使 PAS 膜呈“C”型延伸，包裹待降解的细胞质或细胞器等，形成一个直径约 300 nm 或 900 nm 的闭合双层膜 Cvt 泡或自噬体结构（Klionsky and Emr, 2000; Kihara *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2002）（图 1）。目前已知参与 Atg8-PE 和 Atg12-Atg5 泛素系统的自噬相关蛋白分别为 Atg8，Atg4，Atg7，Atg3 和 Atg12，Atg7，Atg10，Atg5，Atg16，其中 Atg7 作为泛素活化酶 E1 样蛋白在两个系统中均起作用（Klionsky and Emr, 2000; Levine and Klinsky, 2004; Baehrecke, 2005）（图 1）。

3.3 转换自噬与凋亡的分子开关

当饥饿情况下细胞通过低水平 Autophagy 途径的拯救失败，或在动物发育过程中的 PCD 机制被启动，细胞发生高水平 Cvt 途径和 Autophagy 途径的自噬，并可能同时打开凋亡的 Caspases 通路，使细胞走向不可逆的死亡。无论自噬和凋亡在 PCD 机制中的本质是否相同，可以肯定的是二者之间存在一定的联系，这种联系可能与 Atg5 蛋白的功能有关（Codogno and Meijer, 2006）。

Atg5 作为酵母中第一个被发现的自噬相关蛋白（Kametaka *et al.*, 1996），除在自噬体形成中起作用外，还可通过钙蛋白酶的翻译后修饰促进凋亡，从而将自噬与凋亡联系起来。Codogno 和 Meijer（2006）以及 Yousefi 等（2006）分别在研究小鼠和人嗜中性粒细胞时发现，依赖于钙调蛋白的钙蛋白酶 1 和 2 在全长为 33 kD 的 Atg5 第 193 位苏氨酸（Thr）位点切割，形成 24 kD 的 Atg5 产物后，由细胞质转移到线粒体内与抗凋亡分子 Bcl-xl（抑制促凋亡蛋白 Bax 作用的分子）结合，引发细胞色素 C（cytochrome C，CytC）的释放和 caspases 的活化，诱导细胞发生凋亡。因此，Atg5 有可能是细胞 PCD 机制中转换自噬与凋亡的分子开关，但目前对 24 kD 蛋白是否通过抑制 Bcl-xl 而激活 Bax 的作用还不清楚。

最近由线虫 *Caenorhabditis elegans* 的研究发现，线虫的 BEC-1 蛋白作为酵母自噬相关蛋白 Atg6 的同源体，可与抗凋亡蛋白 CED-9/Bcl-2 形成复合物，一旦去除 BEC-1，则引发 CED3/Caspases 依赖性的细胞凋亡，由此推测 Atg6 可能是除 Atg5 之外引发细胞自噬或凋亡的又一个分子开关（Takacs- Vellai *et al.*, 2005）。

3.4 果蝇 BR-C，E74A 和 E93 的分子通路作用

在已知的 27 个酵母自噬相关基因中有 9 个在果蝇中编码同源蛋白基因，其中 7 个随 20-E 引发的唾腺细胞自噬死亡的升高而表现高转录活性，它们是 *apg2*（CG1241），*apg3*（CG6877），*apg4*（CG6194），*apg5*（CG1643），*apg7*（CG5489），*apg9*（CG3615）和 *aut10/cvt18*（CG7986）（Baehrecke, 2003），分别对应于酵母的 *Atg2*，*Atg3*，*Atg4*，*Atg5*，*Atg7*，*Atg9* 和 *Atg10*（Klionsky *et al.*, 2003）。

近几年关于果蝇变态期发生细胞自噬和凋亡的研究，Baehrecke 小组的工作特别引人注目。他们通过一系列研究，发现在果蝇自噬和凋亡两种死亡之间发挥通路作用的分子与凋亡级联调控系统中的

βFTZ-F1,*E93*,*BR-C*,*E74A* 等转录因子有关。

许多研究显示,尽管有蜕皮激素的诱导,但 *βFTZ-F1*,*BR-C*,*E74A* 和 *E93* 的突变将影响果蝇唾腺和中肠细胞的自噬死亡:*BR-C* 和 *E74A* 的突变导致唾腺细胞死亡的推迟,*βFTZ-F1* 和 *E93* 突变则不影响唾腺细胞的死亡,其中 Baehrecke 小组发现单独的 *E93* 突变影响了中肠细胞内的自噬泡形成(Lee *et al*., 2000)。这些结果表明 *E93* 可能处于自噬泡形成信号途径的上游,调节自噬的早期事件,而 *BR-C* 和 *E74A* 的突变则影响了高水平 Autophagy 途径的自噬发生,因此推迟了唾腺细胞的死亡(Baehrecke, 2003)。

在上述突变的形态分析基础上,Baehrecke 小组进一步检测在这些果蝇 *βFTZ-F1*,*BR-C*,*E74A*,*E93* 突变体中的自噬相关基因活性和 caspase 基因活性在果蝇不同组织的表达谱变化,结果表明:*BR-C* 突变导致 *CG6194*(*Atg4*),*CG1643*(*Atg5*)的异位转录和 *CG5489*(*Atg7*)转录水平的下降;*E74A* 突变仅表现为 *Atg4* 转录活性的降低;在 *E93* 突变体中,*CG1241*(*Atg2*),*Atg4*,*Atg5* 和 *Atg7* 的转录表达均被下降(Lee *et al*.,2003)。据此,他们认为在果蝇的 *E93* 突变体中 *Atg4*,*Atg5* 和 *Atg7* 的 RNA 水平下降是导致中肠细胞自噬泡形成受阻的原因之一,这与在酵母 *Atg4*,*Atg5*,*Atg7* 突变体中观察到自噬泡形成受阻(Tsukada and Ohsumi, 1993)的结果相一致。除上述结果外,他们还发现这些突变体同时表现为唾腺细胞 caspases 活性的升高(Martin and Baehrecke, 2004)。

由此,Baehrecke 小组提出了果蝇 BR-C,E74A 和 E93 在细胞凋亡和自噬之间行使分子通路作用的假设,即这 3 个转录因子除具有诱导细胞凋亡的功能外,还能通过死亡调节因子(death regulation factors, DRFs)/非 caspase 蛋白激酶(non-caspase protein kinases, NCPKs)和自噬相关蛋白 Atgs 的功能诱导细胞发生高水平的自噬(Lee *et al*.,2003)。为此 Yin 和 Thummel(2005)对 Baehrecke 小组的工作进行了综述。

所以,在果蝇变态期蜕皮激素激活的凋亡分子通路中,BR-C,E74A 和 E93 除了发挥对凋亡诱导因子 Reaper,Hid 和 Grim 的表达行使正控制作用外,还具有诱导细胞发生高水平自噬的双重功能。当 BR-C,E74A 和 E93 诱导细胞凋亡的功能受阻后,它们仍然可以通过 DRFs/NCPKs 和 Atgs(Atg2,Atg4,Atg5 和 Atg7)的功能使细胞发生高水平的自噬死亡。

3.5 果蝇 Atg1 在 PI3K Ⅰ-Tor 途径的分子通路作用

近几年对果蝇自噬和凋亡分子通路的另一个重要结果是 Scott 等(2004, 2007)和 Rusten 等(2004)的出色工作。他们证实饥饿诱导的果蝇自噬除遵循酵母自噬分子通路中的 PI3K 和 Tor 机制外,由 Atg1 介导进入高水平 Autophagy 途径的自噬能够诱导凋亡形式的细胞死亡(图 2)。

在 Scott 等(2004)的研究中发现:抑制 PI3K Ⅰ-Tor 的分子通路,可使脱磷酸化后的 Atg13 与 Atg1 结合,引发果蝇脂肪体细胞发生高水平 Autophagy 途径的自噬,显示与酵母的 PI3K Ⅰ- Tor 通路一致(图 2)。Rusten 等(2004)在同一年发现:对 20E 信号的抑制则可以阻止果蝇脂肪体中自噬的发生,表明 20E 具有与饥饿信号等同的功能,果蝇变态期发生的自噬是由 20E 通过 PI3K Ⅰ 途径诱导调节的(Rusten *et al*., 2004)。由于这一结果的重要性,Grewal 和 Saucedo(2004)对他们的工作进行了评述。

在上述研究基础上,Scott 等(2007)首先通过果蝇 GAL4/USA 系统制作了野生型 Atg1 和 Atg1 弱表达的转基因品系,以对溶酶体有高效标记的 LysoTracker 染色法测定脂肪体中发生 Autophagy 途径自噬的标记,结果显示正常喂养的野生型 Atg1 和 UAS-Atg1 弱表达的突变体均没有 LysoTracker 染色,但在饥饿条件下它们重新获得了诱导自噬的能力。通过构建可热休克诱导的 Hsp70-GAL4 driver Atg1 高水平表达的转基因品系,借助于 LysoTracker 染色法证实在正常喂养的幼虫新鲜脂肪体中,热休克引发的 Atg1 过量表达可诱导细胞发生高水平 Autophagy 途径的自噬。他们通过进一步的检测发现,由 Atg1 过量表达诱导的高水平自噬强烈地抑制细胞生长,导致细胞很快死亡,表现为 Caspases 依赖性和核 DNA 断裂,说明高水平 Autophagy 途径的自噬能够同时引发凋亡形式的细胞死亡。

在细胞自噬的研究中,转录因子 FOXO 在细胞内的定位可以作为 PI3K 活性值的一个标志。在 PI3K 活性很低的条件下,FOXO 定位在细胞核内,反之,FOXO 则定位在细胞质。在果蝇,Tor 专门磷酸化 S6K 蛋白的第 398 位苏氨酸,小 G 蛋白 Rheb 是 Tor 信号的上游激活子,Scott 等(2007)据此检测了 Atg1 的过量表达对细胞的 PI3K Ⅰ-Tor 分子通路及其生化活性的影响和对 S6K 磷酸化的作用。结果发现:(1)在脂肪体细胞中 Atg1 的过量表达没有

改变 FOXO 在细胞内的定位,提示 Atg1 过量表达不能通过影响“Akt / PKB”上游的 PI3K Ⅰ 信号(见图 2)而诱导自噬;(2)在整个脂肪体中,Atg1 过量表达所引起的细胞生长抑制和自噬的诱导被共表达的小 G 蛋白 Rheb 所抑制,说明在果蝇中和在酵母中一样,Tor 抑制 Atg1 活性;(3)Western blot 分析表明,在 Atg1 过量表达的幼虫脂肪体细胞中,稍微增加 S6K 的水平,S6K 中第 398 位苏氨酸的磷酸化作用被明显降低,而小 G 蛋白 Rheb 的过量表达则增强 S6K 的磷酸化作用,并且当 Rheb 与 Atg1 共表达时能恢复 S6K 的磷酸化作用。这些结果表明 Atg1 过量表达对 PI3K Ⅰ -Tor 分子通路有负调节作用,进而引发细胞同时发生高水平的自噬和凋亡。

依据上述研究结果,Scott 等(2007)对果蝇自噬导致细胞死亡的机制提出了新的观点:认为饥饿诱导的自噬是可容忍和可逆的,对细胞的继续生存有益,不引起细胞死亡。在饥饿条件下,细胞的自我限制机制能防止高水平的自噬,避免因为高水平自噬而导致细胞死亡。但是在果蝇变态期,由于 Atg1 的表达水平在蛹期初始阶段就达到最大值,此时细胞自噬的死亡被诱导,或因蜕皮激素的刺激,另一个自噬机制能阻遏饥饿条件下细胞自噬的自我保护机制,从而引发持续的高水平自噬,同时诱导细胞凋亡,加速细胞的死亡。此外,细胞自噬的死亡也可能是由专一的存活促进因子或死亡抑制因子的选择性降解所引起(Scott *et al.*, 2007)。

4 家蚕变态期细胞自噬和凋亡的研究进展

家蚕作为鳞翅目的模式代表昆虫之一,近几年有关蜕皮激素与受体 EcR/USP 结合激发的相关转录因子及其细胞凋亡因子已有较多的报道。2004 年家蚕基因组计划完成(Xia *et al.*, 2004)后,这些转录因子和凋亡因子的同系物(isoform)基因序列在基因组中也得到确认。它们包括:蜕皮激素受体基因 *BmEcR*(Swevers *et al.*,1996; Kamimura *et al.*, 1996)和 *BmUSP*(Swevers *et al.*,1996; Kamimura *et al.*,1997);转录因子基因 *BmHR39*(Niimi *et al.*, 1997)和 *BmHR3A*(Eystathioy *et al.*, 2001),*BmβFTZ-F1*(Sun *et al.*,1994; Niimi *et al.*, 1997),*BmBR-C-Z1*(Wu *et al.*, 1999),*BmBR-C-Z2* 和 *BmBR-C-Z4*(Ijiro *et al.*, 2004),*BmE74A* 和 *BmE74B*(Sekimoto *et al.*, 2007, Unpublished),*BmE75A*(Swevers *et al.*, 2002),*BmE75B* 和 *BmE75C*(Matsuoka and Fujiwara, 2000)。

另外,通过序列比对和注释,在家蚕基因组中还发现鉴定了一些新的凋亡因子基因序列,包括凋亡的抑制蛋白基因 *BmIAP-a*(Bmb022756),*BmIAP-b*(Bmb022752),*BmIAP-c*(Bmb038139)和 *BmIAP-d*(Bmb002712)以及凋亡的 caspases 成员 *BmCas-a*(Bmb034866),*BmCas-b*(Bmb001418)和 *BmCas-c*(Bmb011497)。

Jia 等(2007)报道了家蚕变态期丝腺组织发生 PCD 过程中的蛋白表达情况。他们由化蛹 12 ~ 15 h检测到丝腺细胞发生的核 DNA 断裂,通过蛋白双向电泳(two-dimensional gel electrophoresis,2-DE)发现在此时期的 1 000 个可再现的表达蛋白斑点中,有 77 个蛋白斑点的表达被下调或上调,通过质谱测定,鉴定了其中 17 个差异表达的蛋白斑点可能与变态期的丝腺发育有关,它们分别归属于已知的 caspase 类蛋白、水解蛋白酶亚基、延长因子(elongation factor)、热激蛋白等和目前未知的蛋白。

我们最近对家蚕的研究发现(待发表),从停止食桑的熟蚕和吐丝期开始,幼虫丝腺和中肠细胞已出现许多内含胞质物质的液泡样 Cvt 泡和少数的凋亡小体,进入化蛹 1 ~2 d,Cvt 泡发展为连片空泡化的结构,同时观察到细胞出现各种自噬体和致密小体,检测到凋亡的核 DNA 断裂。在化蛹初,两种幼虫组织的细胞自噬和凋亡高水平发展,是一个由少数逐渐发展到多数直至全部细胞的过程,导致丝腺组织在化蛹 3 d 完全消亡,幼虫退化肠细胞的自噬和凋亡则一直持续到化蛹后期。在家蚕停止食桑的熟蚕和吐丝期,刚好是蜕皮激素内分泌活性的高峰期,提示这两种幼虫组织细胞的死亡具有蜕皮激素诱导的同步化特征。这一结果与 Vilaplana 等(2007)在灰翅夜蛾变态期发现的中肠细胞死亡的时序相吻合。

对家蚕变态期丝腺和中肠组织发生细胞自噬和凋亡的内在分子联系,我们最近通过形态分析和 real-time PCR 的分子检测及其 RNAi 试验等研究(待发表),显示 *BmBR-C*,*BmE74A* 和 *BmβFTZ-F1* 的早期表达可能在同时诱导细胞自噬和凋亡的启动机制中发挥了关键作用,对 *BmEcR*,*BmBR-C* 和 *BmE74A* 的表达进行干扰后,也显著降低了其他蜕皮激素相关基因的转录活性,严重影响了虫体的正常变态,出现大量不蜕皮的死亡蛹和成虫残翅表型。

5 小结与展望

关于昆虫变态发育的细胞自噬和凋亡,根据目前对果蝇、烟草天蛾和家蚕等昆虫的研究进展,已达成一些基本共识:昆虫细胞在正常情况下仍然发生着低水平 Cvt 途径和 Autophagy 途径的自噬,以维持自身代谢的平衡,在末龄幼虫结束到化蛹之前,由于虫体蜕皮激素内分泌活性的增高,启动了幼虫组织发生高水平细胞自噬和凋亡的 PCD 机制,这两种细胞死亡形式在化蛹之初达到盛期,使细胞走向不可逆的死亡,导致幼虫组织在变态期的退化或完全消亡。

昆虫在变态期发生细胞自噬和凋亡的分子通路,除了遵循酵母和哺乳动物发生自噬的 PI3KⅠ-Tor 和 PI3KⅢ分子通路和发生凋亡的分子通路外,还显示一些个性特征,例如在自噬和凋亡途径之间,果蝇的自噬相关蛋白 Atg1 和蜕皮激素相关因子 βFTZ-F1,E93,BR-C,E74A 等可能具有分子通路联络的作用。

近几年来,有关自噬的研究非常活跃,进展很快。对自噬和凋亡机制的认识,将可能对诱导细胞死亡和保护细胞的药理学策略、疾病治疗策略和防止衰老的干涉策略提出新的概念和思路,对昆虫变态期自噬和凋亡及其分子通路的认识,则可为害虫防治和有益昆虫利用提供新的理论指导。

参 考 文 献(References)

Ashford TP, Porter KR, 1962. Cytoplasmic components in hepatic cell lysosomes. *J. Cell Biol.*, 12: 198-202.

Baehrecke EH, 2003. Autophagic programmed cell death in *Drosophila*. *Cell Death Differ.*, 10(9): 940-945.

Baehrecke EH, 2005. Autophagy: Dual roles in life and death? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 6(6): 505-510.

Bowen ID, Mullarkey K, Morgan SM, 1996. Programmed cell death during metamorphosis in the blow-fly *Calliphora vomitoria*. *Microsc. Res. Tech.*, 34(3): 202-217.

Bursch W, Hochegger K, Torok L, Marian B, Ellinger A, Hermann RS, 2000. Autophagic and apoptotic types of programmed cell death exhibit different fates of cytoskeletal filaments. *J. Cell Sci.*, 113 (Pt7): 1 189-1 198.

Clarke PG, 1990. Developmental cell death: Morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat. Embryol.* (*Berl.*), 181(3): 195-213.

Codogno P, Meijer AJ, 2006. Atg5: More than an autophagy factor. *Nat. Cell Biol.*, 8(10): 1 045-1 047.

Crotzer VL, Blum JS, 2005. Autophagy and intracellular surveillance: Modulating MHC class II antigen presentation with stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102(22): 7 779-7 780.

Dai JD, Gilbert LI, 1997. Programmed cell death of the prothoracic glands of *Manduca sexta* during pupal-adult metamorphosis. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 27(1): 69-78.

Eystathioy T, Swevers L, Iatrou K, 2001. The orphan nuclear receptor *BmHR3A* of *Bombyx mori*: Hormonal control, ovarian expression and functional properties. *Mech. Dev.*, 103(1-2): 107-115.

Franke TF, Hornik CP, Segev L, Shostak GA, Sugimoto C, 2003. PI3K/Akt and apoptosis: Size matters. *Oncogene*, 22(56): 8 983-8 998.

Grewal SS, Saucedo LJ, 2004. Chewing the fat regulating autophagy in *Drosophila*. *Dev. Cell*, 7(2): 148-150.

Gu SH, Chow YS, 2005a. Analysis of ecdysteroidogenic activity of the prothoracic glands during the last larval instar of the silkworm, *Bombyx mori*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 58(1): 17-26.

Gu SH, Chow YS, 2005b. Temporal changes in DNA synthesis of prothoracic gland cells during larval development and their correlation with ecdysteroidogenic activity in the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Exp. Zoolog. A Comp. Exp. Biol.*, 303(4): 249-258.

Gu SH, 2006. Autocrine activation of DNA synthesis in prothoracic gland cells of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.*, 52(2): 136-145.

Guillon-Munos A, van Bemmelen MX, Clarke PG, 2006. Autophagy can be a killer even in apoptosis-competent cells. *Autophagy*, 2(2): 140-142.

Guo EE, Li S, Cao Y, 2008. The hormonal regulation network of insect molting. *Acta Sericologica Sinica*, 34(2): 370-374. [郭恩恩,李胜,曹阳,2008. 昆虫蜕皮的激素调控网络. 蚕业科学,34(2):370-374]

Ijiro T, Urakawa H, Yasukochi Y, Takeda M, Fujiwara Y, 2004. cDNA cloning, gene structure, and expression of Broad-Complex (*BR-C*) genes in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 34(9): 963-969.

Jia SH, Li MW, Zhou B, Liu WB, Zhang Y, Miao XX, Zeng R, Huang YP, 2007. Proteomic analysis of silk gland programmed cell death during metamorphosis of the silkworm *Bombyx mori*. *J. Proteome Res.*, 6(8): 3 003-3 010.

Kamada Y, Funakoshi T, Shintani T, Nagano K, Ohsumi M, Ohsumi Y, 2000. Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. *J. Cell. Biol.*, 150(6): 1 507-1 513.

Kametaka S, Matsuura A, Wada Y, Ohsumi Y, 1996. Structural and functional analyses of APG5, a gene involved in autophagy is essential in yeast. *Gene*, 178(1-2): 139-143.

Kamimura M, Tomita S, Fujiwara H, 1996. Molecular cloning of an ecdysone receptor (B1 isoform) homologue from the silkworm *Bombyx mori*, and its mRNA expression during wing disc development. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, 113(2): 341-347.

Kamimura M, Tomita S, Kiuchi M, Fujiwara H, 1997. Tissue-specific

and stage-specific expression of two silkworm ecdysone receptor isoforms-ecdysteroid-dependent transcription in cultured anterior silk glands. *Eur. J. Biochem.*, 248(3): 786 – 793.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR, 1972. Apoptosis: A basis biological phenomenon with wide-ranging implication in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, 26(4): 239 – 257.

Kihara A, Kabeya Y, Ohsumi Y, Yoshimori T, 2001. Beclin-phosphatidylinositol 3-kinase complex functions at the trans-Golgi network. *EMBO Rep.*, 2(4): 330 – 335.

Kim J, Huang WP, Stromhaug PE, Klionsky DJ, 2002. Convergence of multiple autophagy and cytoplasm to vacuole targeting components to a perivacuolar membrane compartment prior to *de novo* vesicle formation. *J. Biol. Chem.*, 277(1): 763 – 773.

Kinch G, Hoffman KL, Rodrigues EM, Zee MC, Weeks JC, 2003. Steroid-triggered programmed cell death of a motoneuron is autophagic and involves structural changes in mitochondria. *J. Comp. Neurol.*, 457(4): 384 – 403.

Klionsky DJ, Emr SD, 2000. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science*, 290(5 497): 1 717 – 1 721.

Klionsky DJ, Cregg JM, Dunn WA Jr, Emr SD, Sakai Y, Sandoval IV, Sibirny A, Subramani S, Thumm M, Veenhuis M, Ohsumi Y, 2003. A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev. Cell*, 5(4): 539 – 545.

Klinosky DJ, Cuervo AM, Seglen PO, 2007. Methods for monitoring autophagy from yeast to human. *Autophagy*, 3(3): 181 – 206.

Lee CY, Wendel DP, Reid P, Lam G, Thummel CS, Baehrecke EH, 2000. E93 directs steroid-triggered programmed cell death in *Drosophila*. *Mol. Cell*, 6(2): 433 – 443.

Lee CY, Clough EA, Yellon P, Teslovich TM, Stephan DA, Baehrecke EH, 2003. Genome-wide analyses of steroid- and radiation-triggered programmed cell death in *Drosophila*. *Curr. Biol.*, 13(4): 350 – 357.

Levine B, Klinsky DJ, 2004. Development by self-digestion: Molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev. Cell*, 6(4): 463 – 477.

Li QR, Deng XJ, Yang WY, Huang ZJ, Zhong YJ, Cao Y, Xia QY, 2006. Genetic regulators involved in ecdysone-induced programmed cell death in *Drosophila*. *Acta Entomologica Sinica*, 49(1): 118 – 125. [李庆荣，邓小娟，杨婉莹，黄志君，钟仰进，曹阳，夏庆友，2006. 果蝇蜕皮激素诱导程序性细胞死亡的遗传调控因子. 昆虫学报，49(1): 118 – 125]

Lockshin RA, Zakeri Z, 2004. Apoptosis, autophagy, and more. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 36(12): 2 405 – 2 419.

Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G, 2007. Self-eating and self-killing: Crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 8(9): 741 – 752.

Martin DN, Baehrecke EH, 2004. Caspases function in autophagic programmed cell death in *Drosophila*. *Development*, 131(2): 275 – 284.

Matsuoka T, Fujiwara H, 2000. Expression of ecdysteroid-regulated genes is reduced specifically in the wing discs of the wing-deficient mutant (fl) of *Bombyx mori*. *Dev. Genes Evol.*, 210(3): 120 – 128.

Mpakou VE, Nezis IP, Stravopodis DJ, Margaritis LH, Papassideri IS, 2006. Programmed cell death of the ovarian nurse cells during oogenesis of the silkmoth *Bombyx mori*. *Dev. Growth Differ.*, 48(7): 419 – 428.

Mpakou VE, Nezis IP, Stravopodis DJ, Margaritis LH, Papassideri IS, 2008. Different modes of programmed cell death during oogenesis of the silkmoth *Bombyx mori*. *Autophagy*, 4(1): 97 – 100.

Müller F, Adori C, Sass M, 2004. Autophagic and apoptotic features during programmed cell death in the fat body of the tobacco hornworm – *Manduca sexta*). *Eur. J. Cell Biol.*, 83(2): 67 – 78.

Nezis IP, Stravopodis DJ, Margaritis LH, Papassideri IS, 2006. Programmed cell death of follicular epithelium during the late developmental stages of oogenesis in the fruit flies *Bactrocera oleae* and *Ceratitis capitata* (Diptera, Tephritidae) is mediated by autophagy. *Dev. Growth Differ.*, 48(3): 189 – 198.

Niimi T, Morita S, Yamashita O, Yaginuma T, 1997. The profiles of mRNA levels for BHR39, a *Bombyx* homolog of *Drosophila* hormone receptor 39, and *Bombyx* FTZ-F1 in the course of embryonic development and diapause. *Dev. Genes Evol.*, 207: 410 – 412.

Noda T, Ohsumi Y, 1998. Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. *J. Biol. Chem.*, 273(7): 3 963 – 3 966.

Noda T, Suzuki K, Ohsumi Y, 2002. Yeast autophagosomes: *de novo* formation of a membrane structure. *Trends Cell Biol.*, 12(5): 231 – 235.

Petiot A, Ogier-Denis E, Blommaart EF, Meijer AJ, Codogno P, 2000. Distinct classes of phosphatidylinositol 3'-Kinases are involved in signaling pathways that control macroautophagy in HT-29 cells. *J. Biol. Chem.*, 275(2): 992 – 998.

Rusten TE, Lindmo K, Juhász G, Sass M, Seglen PO, Brech A, Stenmark H, 2004. Programmed autophagy in the *Drosophila* fat body is induced by ecdysone through regulation of the PI3K pathway. *Dev. Cell*, 7(2): 179 – 192.

Sarbassov DD, Ali SM, Sabatini DM, 2005. Growing roles for the mTOR pathway. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 17(6): 596 – 603.

Schin KS, Clever U, 1965. Lysosomal and free acid phosphatase in salivary glands of *Chironomus tentans*. *Science*, 150(699): 1 053 – 1 055.

Scharrer B, 1966. Ultrastructural study of the regressing prothoracic glands of blattarian insects. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.*, 69: 1 – 21.

Scott RC, Schuldiner O, Neufeld TP, 2004. Role and regulation of starvation-induced autophagy in the *Drosophila* fat body. *Dev. Cell*, 7(2): 167 – 178.

Scott RC, Juhász G, Neufeld TP, 2007. Direct induction of autophagy by Atg1 inhibits cell growth and induces apoptotic cell death. *Curr. Biol.*, 17(1): 1 – 11.

Sekimoto T, Iwami M, Sakurai S, 2007. 20-Hydroxyecdysone regulation of two isoforms of the Ets transcription factor *E74* gene in

programmed cell death in the silkworm anterior silk gland. *Insect Mol. Biol.*, 16(5): 581–590.

Silva-Zacarin EC, Tomaino GA, Brocheto-Braga MR, Taboga SR, De Moraes RL, 2007. Programmed cell death in the larval salivary glands of *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae). *J. Biosci.*, 32 (2): 309–328.

Sun GC, Hirose S, Ueda H, 1994. Intermittent expression of *BmFTZ-F1*, a member of the nuclear hormone receptor superfamily during development of the silkworm *Bombyx mori*. *Dev. Biol.*, 162(2): 426–437.

Suzuki K, Kirisako T, Kamada Y, Mizushima N, Noda T, Ohsumi Y, 2001. The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation. *EMBO J.*, 20(21): 5 971–5 981.

Swevers L, Cherbas L, Cherbas P, Iatrou K, 1996. *Bombyx* EcR (*BmEcR*) and *Bombyx* USP (*BmCF1*) combine to form a functional ecdysone receptor. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 26(3): 217–221.

Swevers L, Eystathioy T, Iatrou K, 2002. The orphan nuclear receptors *BmE75A* and *BmE75C* of the silkmoth *Bombyx mori*: Hornmonal control and ovarian expression. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 32 (12): 1 643–1 652.

Takacs-Vellai K, Vellai T, Puoti A, Passannante M, Wicky C, Streit A, Kovacs AL, Müller F, 2005. Inactivation of the autophagy gene bec-1 triggers apoptotic cell death in *C. elegans*. *Curr. Biol.*, 15 (16): 1 513–1 517.

Tsukada M, Ohsumi Y, 1993. Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.*, 333(1–2): 169–174.

Velentzas AD, Nezis IP, Stravopodis DJ, Papassideri IS, Margaritis LH, 2007. Apoptosis and autophagy function cooperatively for the efficacious execution of programmed nurse cell death during *Drosophila* virilis oogenesis. *Autophagy*, 3(2): 130–132.

Vilaplana L, Pascual N, Perera N, Bellés X, 2007. Molecular characterization of an inhibitor of apoptosis in the Egyptian armyworm, *Spodoptera littoralis*, and midgut cell death during metamorphosis. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 37 (12): 1 241–1 248.

Wu C, Asakawa S, Shimizu N, Kawasaki S, Yasukochi Y, 1999. Construction and characterization of bacterial artificial chromosome libraries from the silkworm, *Bombyx mori*. *Mol. Gen. Genet.*, 261 (4–5): 698–706.

Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR, 1980. Cell death: The significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.*, 68: 251–306.

Xia QY, Zhou ZY, Lu C *et al.*, 2004. A draft sequence for the genome of the domesticated silkworm (*Bombyx mori*). *Science*, 306 (5 703): 1 937–1 940.

Xu Y, Liu XD, Gong X, Eissa NT, 2008. Signaling pathway of autophagy associated with innate immunity. *Autophagy*, 4(1): 110–112.

Xue L, Fletcher GC, Tolkovsky AM, 1999. Autophagy is activated by apoptotic signalling in sympathetic neurons: An alternative mechanism of death execution. *Mol. Cell Neurosci.*, 14(3): 180–198.

Yang YP, Liang ZQ, Gu ZL, Qin ZH, 2005. Molecular mechanism and regulation of autophagy. *Acta Pharmacol. Sin.*, 26(12): 1 421–1 434.

Yin VP, Thummel CS, 2005. Mechanisms of steroid-triggered programmed cell death in *Drosophila*. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 16 (2): 237–243.

Yorimitsu T, Klionsky DJ, 2005. Autophagy: Molecular machinery for self-eating. *Cell Death Differ.*, 12: 1 542–1 552.

Yousefi S, Perozzo R, Schmid I, Ziemiecki A, Schaffner T, Scapozza L, Brunner T, Simon HU, 2006. Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis. *Nat. Cell Biol.*, 8(10): 1 124–1 132.

Zhong YJ, Zeng L, Huang ZJ, Liu JP, Deng XJ, Yang WY, Cao Y, Gu SH, 2005. Characteristics of degeneration and apoptosis of silk gland during larval-pupal metamorphosis of the silkworm, *Bombyx mori*. *Acta Entomologica Sinica*, 48(3): 319–324. [钟仰进, 曾林, 黄志君, 刘吉平, 邓小娟, 杨婉莹, 曹阳, 顾世江. 2005. 家蚕蛹变态期丝腺组织的退化与细胞凋亡特征. 昆虫学报, 48(3): 319–324]

(责任编辑:赵利辉)